

# 酵母 *Pichia pastoris* による植物由来抗菌タンパク質 AFP1 の生産と AFP1 の作用メカニズムの解析

高久 洋暁\*・小黒 芳史・山崎 晴丈・高木 正道

## はじめに

次世代シーケンサーやオミクス解析技術の革新的な発展により各種生物のゲノム関連情報が集積し、未知遺伝子がコードするタンパク質の機能解析や、さらにはその情報を活用した有用な医薬品・化学品の製造の手段として、組換えタンパク質発現技術への関心は非常に高まっている。そして、その未知の遺伝子がコードするタンパク質の機能および構造を解析するためには、目的タンパク質を十分に得る必要がある。分子生物学の発展により、天然組織から目的タンパク質を精製する代わりに、遺伝子をクローニングまたは合成し、異種宿主細胞内でその遺伝子を発現させ、目的タンパク質を得ることが可能となった。これは天然組織から得ることが困難なタンパク質についても調製可能で、変異導入などの技術と併せ、タンパク質の詳細な機能解析ができることも意味する。異種タンパク質発現系として、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、無細胞系などが開発され、発現系の改良・キット化が進み、より多くのタンパク質合成系が実験室レベルで利用できるようになった。そのため、タンパク質本来の性質（分子量、翻訳後修飾の有無など）だけでなく、時間、コストなどを含めた目的に応じて宿主を選択することが大切である。

大腸菌発現系はもっとも研究が進んでいる発現系であり、目的のタンパク質を短時間で大量に得ることができ、操作も簡便で安価である。このことから大腸菌発現系がタンパク質発現の第一の選択肢としてよく利用されるが、高等生物のタンパク質やジスルフィド結合を有する分泌タンパク質の発現では、封入体を形成するが多い。この場合、封入体を単離し、タンパク質変性剤で可溶化したのち、透析や希釈により変性剤を除いて活性型のタンパク質に巻き戻す(リフォールディング)の操作が必要になる。また、ジスルフィド結合を有するタンパク質の場合は、さらに①空気酸化、②酸化型/還元型グルタチオンを用いた酸化還元シャッフリング、③ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) のいずれかを上記リフォールディング操作に加える。

酵母の発現系は、真核生物の中でももっとも容易に、また安価に利用できる発現系である。大腸菌における高

等生物由来のタンパク質やジスルフィド結合を有する分泌タンパク質の発現では、凝集体形成・発現量が低いなどの問題が生じることがあるが、このようなタンパク質に対して酵母の発現系では増殖時間が比較的短く大腸菌に匹敵するタンパク質発現量が可能であり、封入体を形成しにくいとされている。また、酵母発現系として、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピキア酵母 (*Pichia pastoris*) などさまざまな酵母を用いた発現系があるが、主に分泌タンパク質に対しては *P. pastoris* を宿主としたタンパク質分泌発現系の成功例が多い。*P. pastoris* タンパク質発現系の特徴は、メタノールにより誘導されるアルコール酸化酵素遺伝子 (*AOX1*) などの強力なプロモーターを利用していること、メタノールを炭素源とする合成培地を用いた高密度培養法が確立していることである<sup>1)</sup>。目的タンパク質の種類によってはグラムスケールの発現が可能であり工業利用に適している<sup>1)</sup>。

昆虫細胞や動物細胞の発現系は、大腸菌および酵母などの微生物を宿主とした発現系と比較するとタンパク質発現量が低く、コストは高い。特に動物細胞の場合には、実験室系で大量培養しようとする大掛かりな設備が必要になる。しかしながら、高分子量のタンパク質の発現、翻訳後修飾などが可能という利点があり、タンパク質医薬品のような高付加価値製品の生産系に利用されることが多い。

無細胞発現系は、細胞毒性を有するタンパク質、人工タンパク質の合成などに利用されるが、タンパク質発現量およびコストに難があり、さらに還元的条件下でタンパク質合成反応を実施するため、ジスルフィド結合を有するタンパク質の合成には適さない。

これまで我々は、細菌および真菌に抗菌活性を示す小さく、塩基性で、システインに富むペプチドの植物ディフェンシンに注目して研究を行ってきた。この植物ディフェンシンは、環境にやさしく安全性が高い植物由来の抗菌性タンパク質であることから、抗菌剤として大きな潜在的需要を有する。植物ディフェンシンのアミノ酸配列は多種多様であるが、システイン残基の位置は高度に保存され、システイン残基間で形成される分子内ジスルフィド結合により保持される立体構造が抗菌活性に非常

\* 著者紹介 新潟薬科大学応用生命科学部 (教授) E-mail: htakaku@nupals.ac.jp

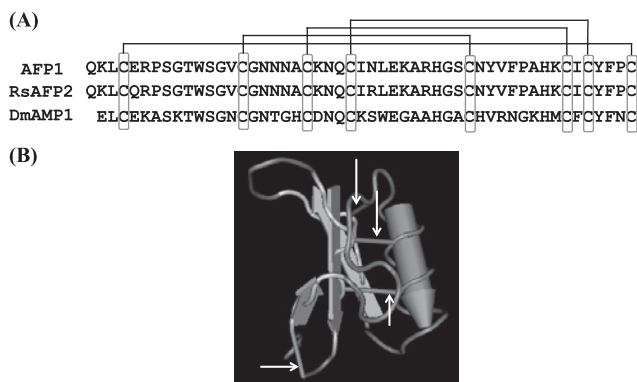


図1. AFP1のアミノ酸配列とジスルフィド結合部位 (A) と予測される立体構造 (B). AFP1: カラシナ由来植物ディフェンシン, RsAFP2: ダイコン由来植物ディフェンシン, DmAMP1: ダリア由来植物ディフェンシン, 矢印はジスルフィド結合を示す.

に重要である<sup>2)</sup> (図1).

本稿では、産業的利用へ向けた組換え微生物を利用した植物ディフェンシンの低コスト・大量生産システムの構築、さらには創薬開発へ向けた組換え植物ディフェンシンの標的微生物への作用メカニズムについて概説する.

### 大腸菌による植物ディフェンシン AFP1 (antifungal peptide 1) の生産

我々が注目した植物ディフェンシンAFP1は、和カラシの材料として利用されているアブラナ科のカラシナ由来の抗真菌タンパク質で、カラシナ種子から単離・精製された<sup>2)</sup>. AFP1は、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* およびカンジダ症原因菌 *Candida albicans* に対して高い抗菌活性を示し、農薬、医薬としての潜在的な価値を有していた. しかしながら、カラシナ種子から抽出し、精製できたAFP1はわずかであり、研究用途に利用するにしても不十分であった. そこでAFP1をコードするcDNAをクローニングし、His (ヒスチジン) tag 融合ベクター、GST (グルタチオンS-トランスフェラーゼ) tag 融合ベクター、Intein (インテイン) tag 融合ベクターに連結し、大腸菌体内で発現させた. Hisタグ融合AFP1は、封入体を形成し、可溶性の画分に見いだすことはできなかった. 発現タンパク質の溶解性を高めるGSTおよびInteinとの融合AFP1は、可溶性の画分にならずに見いだすことができたので、それぞれの可溶性画分から、それぞれに適したアフィニティー担体を利用して融合タンパク質の精製を行い、さらにプロテアーゼで消化してtagの除去を行った. それぞれから得られた組換えAFP1は、天然型のAFP1と同等の抗菌活性を示した<sup>3)</sup>. しかしながら、どちらも培養液1Lあたり最大50 µg程度の組換えAFP1しか精製できなかったことか

ら、抗菌活性スペクトラム、作用メカニズム研究の実施においても量的に不十分で、産業利用など考えられなかった. AFP1は分子内ジスルフィド結合を4つ有し、高次構造を維持することにより抗菌活性を示している (図1). 大腸菌体内は強い還元条件下にあるため、ジスルフィド結合を形成し本来の立体構造を再現するのは困難であると考えられる. そこで、不溶性画分の組換えAFP1を変性剤グアニジン塩酸塩および尿素で処理して可溶化後、透析により徐々に変性剤を除去させるに伴い、変性させずにタンパク質の凝集効果を抑制するL-アルギニンを徐々に加え、その後、ジスルフィド結合形成を促す酸化型グルタチオン添加し、組換えAFP1のリフォーリング操作を行った. 再生した組換えAFP1は、天然型のAFP1と同等の抗菌活性を有し、収量も培養液1Lあたり最大300 µgとなったが、抗菌タンパク質研究を実施するには十分な量とはいえない状況であった<sup>4)</sup>. 大腸菌を宿主として、複数のジスルフィド結合を有するタンパク質の産業用途を見据えた十分な合成は困難であり、ジスルフィド結合形成可能な宿主の選択が好ましいことが明らかとなった.

### 酵母による植物ディフェンシンAFP1の生産

タンパク質が折りたたまれるのはシステイン残基のチオール基同士が酸化的に結合し、ジスルフィド結合を生成するためで、正しいジスルフィド結合はAFP1の高次構造、すなわち活性に必須である. 天然型と同様の抗菌活性を維持する組換えAFP1を大量に得ようとする際、組換えAFP1合成時のジスルフィド結合形成が鍵となっていると考えられたため、真核生物の分子シャペロン機能を有し、ジスルフィド結合を持つ組換えタンパク質合成成功例の多い酵母を宿主として選択した<sup>5,6)</sup>. 宿主-ベクター系、形質転換系が非常に良く整備されている出芽酵母 *S. cerevisiae* を AFP1 cDNA を有する発現プラスミドで形質転換し、発現を試みたが、ほとんど組換えAFP1の発現は認められなかった. そこで、特にジスルフィド結合を持つ組換えタンパク質の発現成功例が多い酵母 *P. pastoris* を宿主として選択し、組換えAFP1の発現を試みた. インビトロジェン社からピキア酵母発現用プラスミドが販売されており、菌体内発現用ベクター pPIC3.5 と菌体外分泌用ベクター pPIC9 を利用して、AFP1 発現コンストラクトを作製し、*P. pastoris* 染色体上へ挿入した. 菌体内AFP1発現ベクターを導入した組換え *P. pastoris* では十分な組換えAFP1の発現は確認できなかったが、菌体外AFP1分泌発現ベクターを導入した組換え *P. pastoris* の培養上清中から、多量の組換えAFP1を検出することができた (図2). タンパク質を細胞外に分泌する過程において、さまざまなシャペロンタ

ンパク質の影響を受け、正しい構造に折りたたまれた状態で目的のタンパク質が分泌される。特に菌体外への分泌は、N末端から膜を通じて起こるため、菌体外に分泌された部分から順に2次構造を形成し、正確な3次構造形成へとつながるため、正常な構造を形成するのに有利になると推測される。以上のことから、分子内ジスルフィド結合を4つも有するAFP1の発現に、*P. pastoris*の分泌発現システムが適合したと考えられる。また、分泌生産は菌体内蓄積でなく、培養液中への蓄積であるため、最終的な生産量を上げるためにも有利で産業用途への利活用も視野に入れることが可能である。

次に得られたAFP1分泌発現株のAFP1至適生産条件の検討を行った。

①宿主菌株：培養液中に蓄積しているAFP1の分解が質量分析により観察されたことから、タンパク質分解酵素proteinase A欠失株SMD1168を利用した。また、AFP1は*P. pastoris*に対して抗菌活性を示すことから、抗菌活性を阻害する高塩濃度培地でAFP1合成を実施するか、AFP1の標的分子グルコシルセラミド欠失株を利用した。

②培養法：AFP1遺伝子を高発現させるため、強力なメタノール発現誘導プロモーターを利用したため、メタノール流加培養法により実施した。培養開始48時間目までは、生育至適温度の30°C条件下で炭素源のグリセロール流加培養などにより、菌体密度を増加させた。培養開始48～120時間目までは、合成されるAFP1の分解を抑えるため、培養温度を20°Cまで下げ、メタノールを流加しながらAFP1を分泌生産させた。

以上の生産条件下で、AFP1を分泌生産させた結果、培養液1Lあたり130mgの組換えAFP1の培養液中への分泌生産に成功した。培養液から遠心分離で菌体を除

去後、陽イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを利用して精製した結果、高純度の組換えAFP1を培養液1Lあたり100mg以上取得することに成功し、研究を実施する上で十分量のAFP1を得ることができた<sup>7)</sup>(図2)。また、精製組換えAFP1の抗菌活性強度は天然AFP1と同様であり、活性にも問題は見られなかった。さらに窒素源として酵母エキスを流加しながら長時間の流加培養を行うことにより、培養液1Lあたり約1gの組換えAFP1の生産ができる可能性を見いだしたが、分解などにより短くなったAFP1が混在する問題を抱えた。この分解問題を克服することにより産業用途の道が開けると考えている。

### 組換えAFP1を用いたカンジダ症原因菌*C. albicans*に対するAFP1の作用メカニズム解析

酵母*P. pastoris*で生産させた組換えAFP1の抗菌活性スペクトラムを調査した結果、大腸菌、枯草菌などの細菌にはまったく効果を発揮せず、真菌の酵母、糸状菌に対して強い抗菌活性を示した(表1)。医薬用途への展開も考慮し、抗菌活性を示したカンジダ症原因菌*C. albicans*を標的微生物に定め、*P. pastoris*で生産した組換えAFP1を利用して作用メカニズムの解析を行った。

まず、AFP1の酵母に対する生理学的な効果を明らかにするために、細胞膜脱分極化の指示薬bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxonol (DiBAC4(3))と活性酸素(ROS)産生の指示薬2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFHDA)を利用して、細胞内の状態を調べた。AFP1の濃度依存的に細胞内のDiBAC4(3)およびDCFHDAの蛍光レベルは上昇し、さらに生育阻害の程度も大きくなり、生菌数の減少が見られた。すなわち、細胞膜の脱分極化、ROSの産生は、*C. albicans*の細胞死の起因の一つであると考えられた<sup>7)</sup>。

また、膜の脱分極化とROSの産生のどちらが直接、細胞の生菌率に影響をきたしているかを、細胞膜の脱分極化

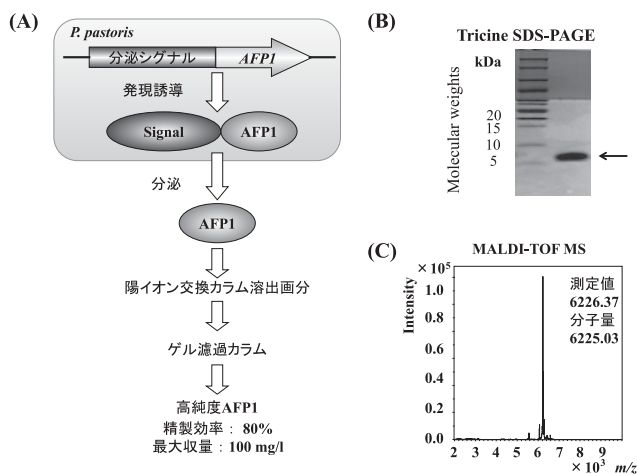


図2. *P. pastoris*によるAFP1の分泌生産および精製フロー(A)と精製AFP1の分析(B), (C)

表1. 抗菌活性スペクトラム

	微生物種	半数阻害濃度 (μg/ml)
細菌	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	> 30
	<i>Bacillus subtilis</i> M168	> 30
酵母	<i>Candida albicans</i> CA14	3.5
	<i>Pichia pastoris</i> SMD1168	1.7
	<i>Kluyveromyces lactis</i> GG799	11.3
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-1A	> 30
糸状菌	<i>Magnaporthe oryzae</i> Guy11	1.0
	<i>Trichophyton rubrum</i>	2.0
	<i>Aspergillus nidulans</i> ///-10, 14	1.0

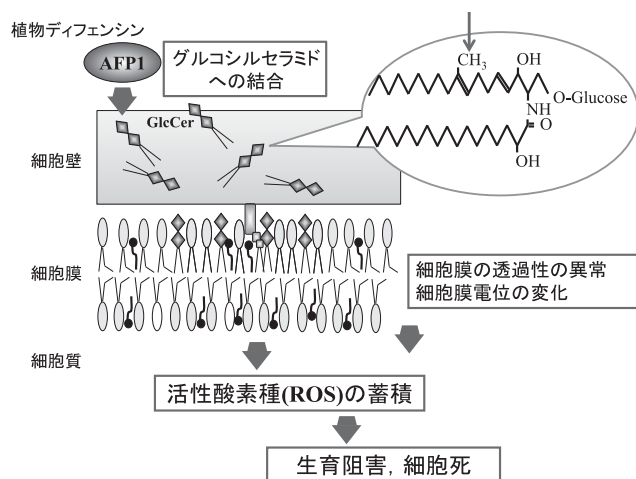


図3. *C. albicans*におけるAFP1の作用メカニズム

の捕捉剤であるcarbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP)とROS産生の捕捉剤であるアスコルビン酸を*C. albicans*の生育を阻害しない程度に添加し、菌の生育と生菌率について調べた。その結果、膜の脱分極化がROS産生を誘導し、ROS産生が生菌率に影響を与えることが明らかとなった<sup>7)</sup>(図3)。

AFP1の抗菌活性スペクトラムを調査する中で、*C. albicans*, *C. maltose*, *Kluveromyces lactis*, *P. pastoris*, *M. grisea*, 白癬菌*Trichophyton rubrum*に抗菌活性を示したのに対し、酵母*S. cerevisiae*に対してだけが抗菌活性を示さなかった(表1)。この事柄に注目し、これらの細胞壁および細胞膜構成成分の違いに注目したところ、抗菌活性を示した真菌はすべて細胞壁および細胞膜構成成分としてグルコシルセラミド(GlcCer)を有するが、*S. cerevisiae*にはなかった。そこで、*C. albicans* GlcCer合成酵素欠損株( $\Delta gcs$ )を作製し、AFP1感受性を検証した結果、 $\Delta gcs$ 株はAFP1に対して耐性を示した。また、AFP1を作用させた時、野生株では細胞膜脱分極化および菌体内におけるROS蓄積が生じ、それに伴い生菌率が減少していたが、 $\Delta gcs$ 株においては観察されなかった。また、*P. pastoris*で大量に調製できるようになったAFP1を利用して、抗AFP1抗体を作製し、その抗体を利用して*C. albicans*由来精製GlcCerとAFP1の結合を調べた結果、直接結合することが明らかとなった(未発表データ)。以上から、AFP1がGlcCerに結合後、細胞膜脱分極化およびROS蓄積が誘導され、*C. albicans*の細胞死につながる事が示唆された(図3)。

次に我々はGlcCer構造に注目した。GlcCerは、ある種の真菌、ヒト細胞も有しており、特にヒト細胞では、恒常性の維持に重要な因子として知られている。さらにヒト細胞もGlcCerを持つがAFP1非感受性を示すことが分かっている。AFP1感受性真菌とヒト細

胞のGlcCer構造の相違点に注目し、比較した結果、AFP1感受性真菌の有するGlcCerは、ヒト細胞の有するGlcCerと次の2点で異なることが判明した。①長鎖塩基側鎖の9番目の炭素にメチル基を有する(図3)。②長鎖塩基側鎖の8, 9番目の炭素間に二重結合を有する(図3)。そこで我々は、AFP1感受性真菌*C. albicans*を利用して、メチル基・二重結合を欠失したGlcCer構造を有する*C. albicans*変異株( $\Delta sld1$ )とメチル基を欠失したGlcCer構造を有する*C. albicans*変異株( $\Delta mts1$ )を作製後、AFP1抗菌活性強度の検討を行った。その結果、 $\Delta sld1$ 株、 $\Delta mts1$ 株は、共に野生株と比較してAFP1低感受性を示した。特にメチル基・二重結合欠失GlcCer構造を有する $\Delta sld1$ 株の低感受性の程度は大きかった。すなわち、AFP1の抗菌活性強度には、GlcCer分子構造上のメチル基、二重結合部位の認識が大きく関与していることが示唆され、また、AFP1の抗菌作用は、特異性が高いことが予想された<sup>7)</sup>(図3)。

### おわりに

モデル生物となっている出芽酵母*S. cerevisiae*の育種ツール(変異株、組換え技術、プロモーター(誘導型、抑制型)、過剰発現など)および遺伝子情報にはすばらしいものがある。しかしながら、non-conventional yeastには、*S. cerevisiae*よりもユニークで素晴らしい能力が備わっている酵母も存在する。本稿で紹介した*P. pastoris*のジスルフィド結合を有するタンパク質の分泌大量発現はその一例になると思われる。現在、化石資源の枯渇問題を抱え、これまでのオイルリファイナリーからバイオマスから物質を生産するバイオリファイナリーへのパラダイムシフトの必要性がクローズアップされ、この産業システムの一部をnon-conventional yeastは支えるポテンシャルを有していると考えている。

大腸菌によるAFP1生産・精製技術は、ご指導賜りました提箸祥幸先生(農業・食品産業技術総合研究機構)をはじめとする諸先生方のご協力によるものです。また、本研究は生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業の支援により行われました。ここに記し厚く御礼を申し上げます。

### 文 献

- 1) Macauley-Patrick, S. *et al.*: *Yeast*, **22**, 249 (2005).
- 2) van der Weerden, N. L. *et al.*: *Cell Mol. Life Sci.*, **70**, 3545 (2013).
- 3) Sagehashi, Y. *et al.*: *J. Pestic. Sci.*, **38**, 33 (2013).
- 4) 提箸祥幸ら: 中央農研研究報告, **19**, 1 (2013).
- 5) Damasceno, L. M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 31 (2012).
- 6) Tu, J. *et al.*: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 2082 (2015).
- 7) Oguro, Y. *et al.*: *Curr. Genet.*, **60**, 89 (2014).